

M
E
N
UeRed Folder: [Previous Doc](#) [Next Doc](#) [Go to Doc#](#)
[First Hit](#)☐

L4: Entry 13 of 16

File: JPAB

Mar 4, 1986

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 61044826 A
TITLE: GAMMA-INTERFERON COMPOSITIONAbstract Text (2):

CONSTITUTION: An amino acid (e.g. monoamino-aliphatic amino acid) is added ton an aqueous solution containing human γ -type interferon [e.g. des(Cys-Tyr- Cys)IFN- γ] and essentially free of inorganic salt. The mixture is frozen and if necessary, dried under reduced pressure to obtain the human IFN- γ composition. The specific activity of the human IFN- γ is 1x105-1x107IU/mg, and that of the aqueous solution of the human IFN- γ is preferably 1x102-1x107IU/ml. The loss of IFN- γ in the freezing and freeze-drying procedures can be decreased and a stable composition forming clear solution by dissolution can be prepared by using the aqueous solution of IFN- γ having decreased inorganic salt concentration (preferably $\geq 0.05M$).

Application Date (1):
19850704[Previous Doc](#) [Next Doc](#) [Go to Doc#](#)

⑩ 公開特許公報 (A) 昭61-44826

⑫ Int. Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号	⑬ 公開 昭和61年(1986)3月4日
A 61 K 45/02		7043-4C	
C 07 K 15/26		8464-4H	
C 12 N 15/00		7115-4B	
// C 12 P 21/00		7235-4B	審査請求 未請求 発明の数 3 (全12頁)

⑭ 発明の名称 γ 型インターフェロン組成物

⑮ 特 願 昭60-148093

⑯ 出 願 昭60(1985)7月4日

優先権主張 ⑰ 1984年7月10日 ⑱ 世界知的所有権機関(WO) ⑲ PCT/JP84/00352

⑰ 1985年4月12日 ⑱ 世界知的所有権機関(WO) ⑲ PCT/JP85/00190

⑳ 発 明 者 赤 木 弥 三 郎 高槻市松が丘3丁目18番18号

㉑ 発 明 者 三 浦 泰 幹 川西市清和台西2丁目4番地の43

㉒ 発 明 者 星 野 哲 夫 豊中市寺内2丁目13番37号

㉓ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪市東区道修町2丁目27番地

㉔ 代 理 人 弁理士 天井 作次

明 細 書

1. 発明の名称

γ 型インターフェロン組成物

2. 特許請求の範囲

(1) 実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が共存する条件下に凍結もしくは凍結乾燥したヒト γ 型インターフェロン組成物。

(2) アミノ酸がモノアミノ脂族アミノ酸である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(3) ヒト γ 型インターフェロンが遺伝子組み換え技術で得られるヒト γ 型インターフェロンである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(4) 遺伝子組み換え技術で得られるヒト γ 型インターフェロンの真露度含有水溶液由来のヒト γ 型インターフェロンである特許請求の範囲第3項記載の組成物。

(5) ヒト γ 型インターフェロンの比活性が $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ IU/mgである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(6) ヒト γ 型インターフェロンが水溶液として

$1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-1}$ IU/mlの濃度である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(7) ヒト γ 型インターフェロンが第1図で示される146個のアミノ酸配列からなるポリペプチドである特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(8) ヒト γ 型インターフェロンがデス(Cys¹-Tyr²-Cys³)1FN-7である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(9) アミノ酸が水溶液として $5 \sim 50$ mg/mlの濃度である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(10) モノアミノ脂族アミノ酸に加えヒト血清アルブミンを含有する特許請求の範囲第2項記載の組成物。

(11) ヒト血清アルブミンが水溶液として $2 \sim 20$ mg/mlの濃度である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

(12) モノアミノ脂族アミノ酸が中性モノアミノ脂族アミノ酸である特許請求の範囲第10項記載の組成物。

- (13) 中性モノアミノ脂肪族アミノ酸がグリシンである特許請求の範囲第12項記載の組成物。
- (14) 水溶液としてpH4.0～5.0を示すように調整された特許請求の範囲第12項記載の組成物。
- (15) モノアミノ脂肪族アミノ酸が酸性モノアミノ脂肪族アミノ酸である特許請求の範囲第10項記載の組成物。
- (16) 水溶液としてpH7.5～8.5を示すように調整された特許請求の範囲第15項記載の組成物。
- (17) さらに造膜を含有せしめた特許請求の範囲第2項または第10項記載の組成物。
- (18) 顆粒が多量である特許請求の範囲第17項記載の組成物。
- (19) 顆粒が水溶液として3～50mg/ml濃度である特許請求の範囲第17項記載の組成物。
- (20) 無機塩の濃度が水溶液として0.1M以下である特許請求の範囲第17項記載の組成物。
- (21) 無機塩の濃度が水溶液として0.05M以下であ

- る特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (22) 無機塩の濃度が水溶液として1m以下である特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (23) 凍結品である特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (24) 凍結乾燥品である特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (25) ヒト型インターフェロンを含有する実質的に無機塩が存在しない水溶液にアミノ酸を添加して凍結し、所望により得られる凍結組成物を減圧下乾燥することを特徴とする実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が共存する条件下に凍結もしくは凍結乾燥したヒト型インターフェロン組成物の製造法。
- (26) ヒト型インターフェロンを含有する実質的に無機塩が存在しない水溶液にアミノ酸を添加して凍結し、所望により得られる凍結組成物を減圧下乾燥することを特徴とするヒト型インターフェロンの安定化法。
3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、ヒト型インターフェロン組成物に関する。

従来の技術

ヒトインターフェロンは現在、 α 型、 β 型および γ 型の3種類に分類されている。 α 型および β 型インターフェロンは比較的に安定で、主として非経口投与剤の形態で臨床に用いられ、組織的臨床研究も進んでいる。一方、 γ 型インターフェロン(IFN- γ)と略称することがある)は極めて不安定で、水溶液の保存、凍結あるいは凍結乾燥の操作において、容易にその活性を減じ、また凍結乾燥品を再溶解した液に露りを感じる等の問題を有し、臨床に使用するに値する安定な組成物を得ることを、極めて困難にしている。その為、インターフェロンの中でも著しく強い抗ウイルス作用や免疫賦作用[サルビンラ、ジャーナル オブ ランソナル キャンサー インスタチュート 第57巻、1233頁(1975)]を有し、癌薬として最も期待の人3いIFN- γ の臨床応用への大きな助け

となっている。

ところで、製剤に供せられるインターフェロンの原体は通常、粗インターフェロンから各種のクロマトグラフィー等を駆使した分離・精製工程を経て高純度のものとして得られる。本分離・精製工程では、種々の無機、有機化合物が使用され、例えばpHおよびイオン強度の調整に用いられた無機イオンが精製インターフェロン水溶液中に存在するが、該無機イオン(無機塩)は製剤化した場合にも、安定化剤等として有利に作用すると考えられていた。

たとえば、糖類を持たない β 型インターフェロンにおいては、無機塩を添加することにより安定化されるとの知見が開示されている(特開昭59-25364号公報)。

発明が解決しようとする問題点

本発明者らはかかる技術背景上、無機塩の濃度を低下せしめたIFN- γ 水溶液を用いて製剤化すると意外にも、凍結および凍結乾燥の操作において、従来の無機塩含有IFN- γ 水溶液の1記

操作にわたるよりも、一層 I F N- γ 活性の低下が少なく、また得られた組成物を再溶解した液に稠りを認めることのない安定な I F N- γ 組成物が得られることを見出し、さらに研究を重ね本発明を完成した。

問題を解決するための手段

本発明は、実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が共存する条件下に凍結もしくは凍結乾燥したヒト γ 型インターフェロン組成物を提供するものである。

本発明に用いられる I F N- γ は、ヒト由来のものであって天然の、あるいは遺伝子組み換え技術で得られるいずれの I F N- γ でもよい。とりわけ遺伝子組み換え技術で得られるヒト I F N- γ (r I F N- γ) が有利に使用される。

より具体的には、上記 r I F N- γ は、第 1 図で例示される 146 個のアミノ酸からなるポリペプチドやそのオリゴペプチドの様々なフラグメントを包含する。夥々のフラグメントとしては、例えば上記ポリペプチドの N 末端部分の 4 個以下のア

ミノ酸が欠落した N 末端部欠落スปีシーズや上記ポリペプチドもしくは N 末端部欠落スปีシーズの第 131 番アミノ酸残基以降の部位で切断された C 末端部欠落スปีシーズなどが挙げられる。さらに上記 r I F N- γ は上記ポリペプチドのシステイン残基がセリンもしくはスレオニンに置換されたものも包含する。

上記種々のフラグメントの中では、第 1 図で示される 146 個のアミノ酸からなるポリペプチドの N 末端部分の 4 個以下のアミノ酸が欠落した N 末端部欠落スปีシーズまたは当該 N 末端部欠落スปีシーズの C 末端部分が切断されたものが好ましい。

とりわけ本発明のヒト I F N- γ としては第 1 図で示される 146 個のアミノ酸からなるポリペ

プチドまたはそのオリゴペプチドの $\begin{matrix} 1 & 2 \\ \text{Cys} & \text{Tyr} \end{matrix}$ - $\begin{matrix} 3 \\ \text{Cys} \end{matrix}$ 欠落スปีシーズ [デス ($\begin{matrix} 1 & 2 \\ \text{Cys} & \text{Tyr} \end{matrix}$ - $\begin{matrix} 3 \\ \text{Cys} \end{matrix}$) I F N- γ] が好ましい。

また遺伝子組み換え技術で得られるヒト I F N

- γ を高濃度に含有する水溶液が有利に使用される。

ヒト I F N- γ の非活性は、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-9}$ 国際単位 / μg (IU/ μg) であることが好ましく、I F N- γ 水溶液としては、 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-6}$ IU / μg 、とりわけ $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-5}$ IU / μg の活性を有するものが好ましい。

上記 I F N- γ 水溶液として実質的に無機塩を含有しないものを用いられるが、ここで無機塩の濃度は 0.1M 以下であればよく、0.05M 以下、とりわけ 1mM 以下であることが好ましい。また無機イオン溶液としては、無機イオンから計算されるイオン強度が 0.1 以下であればよく、0.05 以下、とりわけ 0.001 以下であることが好ましい。さらに凍結乾燥組成物においては、その全重量に対し、無機塩が 3% 以下であればよく 1% 以下、とりわけ 0.3% 以下であることが好ましい。

実質的に無機塩を含まない I F N- γ 水溶液は、たとえば I F N- γ の精製工程ととりわけその最終上澄のクロマトグラフィー操作で用いる緩衝液と

して無機塩非含有緩衝液を用いることにより、あるいは精製された I F N- γ 水溶液から無機塩を除去することにより製造することができる。

アミノ酸としては、グリシン、 α -アラニン、 β -アラニン、ロイシン、グルタミン酸、アスパラギン酸などモノアミノ脂肪族アミノ酸が好ましく、とりわけグリシンが好ましい。またこれらの生理学的に許容される塩もしくは誘導体でもよい。これらアミノ酸は 1 種または 2 種以上使用することができ、使用するアミノ酸は市販のものを使用できるが、本組成物を医薬応用するするには、非注射剤に用いられる程度の品質のものが好ましい。

アミノ酸はそれらの全量として、I F N- γ 水溶液 1ml 当たり 1mg 以上、好ましくは 5 \sim 50mg 配合することが好ましい。

また本発明の組成物は、I F N- γ がシステイン残基を有する場合還元性置換化合物を共存せしめてもよい。該還元性置換化合物として、グルタチオン(還元型)、チオクト酸、チオグリコール、チオエタノールアミン、モノチオグリセロール、ジ

チオスレートルおよび炭素数1〜7のチオアルカン酸が挙げられるがとりわけ、グルタチオン(還元型)が好ましい。還元性硫黄化合物を共存せしめる場合、1FN-γ水溶液1ml当り還元性硫黄化合物0.1mg以上、とりわけ0.5〜1.0mgが好ましい。

更に他の安定化剤としてヒト血清アルブミン(HSA)または(および)糖類を加えることができる。HSAとしては、いかなるものでもよいが、本組成物を臨床応用するためには、非経口投与に用いる程度の品質のものが好ましい。例えば、健康人血漿を原料としてCohnのエタノール分画第6法によって、分画精製したもの[ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサエティ、第68巻、459〜475頁(1946)]が用いられる。またHSAは安定剤としてアセチルトリプトファンナトリウムや、カプリル酸ナトリウムを含有するものであってもよい。

HSAは1FN-γ水溶液に対し水溶液1ml当り1mg以上、とりわけ2mg〜20mg含有させるこ

とが好ましい。

上記した助剤を加える場合は、1FN-γ水溶液1ml当り1mg以上、好ましくは3mg〜50mg含有させることが好ましい。

本組成物は、更に凍結圧の調整剤としての前記糖類または(および)アミノ酸類等を含有していてもよいが、塩化ナトリウムのような無機塩を添加することは、反って組成物の品質を劣化させるので、好ましくない。上記の好ましい凍結圧の調整剤は該組成物に予め加えておくか、凍結乾燥品を再溶解する溶液中に加えてもよい。

本発明の凍結および凍結乾燥したヒト1FN-γ粗成物は、例えば以下の方法により製造することができる。

実質的に無機塩が存在しないヒト1FN-γ1×10⁻⁷〜1×10⁻¹U/ml含有水溶液に、アミノ酸を1mg/ml以上、好ましくは5〜50mg/mlの濃度にならうに加える。なお該1FN-γ含有水溶液には、その製造過程において上記アミノ酸を添加することができ、このアミノ酸をも含

とが好ましい。

本発明の組成物がHSAを含有する場合においては、溶液状態でpH4.0〜5.0または7.5〜8.5を示すように調整することが好ましい。より詳しくは、上記アミノ酸類が中性アミノ酸類である場合は、pH4.0〜5.0に、酸性アミノ酸類である場合はpH7.5〜8.5に調整することが好ましい。

糖類としては、例えばデキストラン、ヒドロキシエチル澱粉のような多糖類、シロ糖、マルトースおよび乳糖のような二糖類およびブドウ糖、果糖、マンノースおよびガラクトースのような単糖類から選ばれた1種または2種以上の物質が挙げられる。

上記デキストランおよびヒドロキシエチル澱粉に關し、これらは市販のものを使用できるが、本組成物を臨床応用するためには、代用血漿として非経口投与に用いられる程度の品質のものが好ましい。デキストランは、平均分子量1万〜10万、とりわけ4万〜7万のものが、ヒドロキシエチル澱粉は、平均分子量1万〜20万、とりわけ2万

を有する1FN-γ水溶液を用いる場合は、そのまま、または必要により上記アミノ酸の濃度までアミノ酸を追加して以下の工程に付すことができる。

更に上記したHSAや糖類なども合せて加えることができる。

上記1FN-γ水溶液には、0.1mg/ml以上、好ましくは0.5〜10mg/mlの還元性硫黄化合物や澱粉の界面活性剤を含有していてもよく、また上記安定剤と同様、これらを断たに加えることもできる。

また所望によりpH調整を行う場合は、硫酸(塩酸、硝酸など)または(および)無機塩基(水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムなど)水溶液を加え所定のpHに調整する。

本発明の凍結したヒト1FN-γ粗成物は、例えば上記水溶液を通常-80[°]〜-30[°]で凍結することにより製造される。該凍結粗成物は-80[°]〜-10[°]で保存することが好ましい。

本発明の凍結乾燥したヒト1FN-γ粗成物は、例えば上記凍結粗成物を常法により減圧乾燥する

か上記水溶液または上記凍結組成物の融解により得られる水溶液を、所望により小分けし、上記同様に凍結した後、常法により減圧乾燥することにより製造することができる。

注射用製剤としての本発明の凍結乾燥したヒトIFN- γ 組成物を製造する場合は、小分けする前に該組成物水溶液あるいはその成分をそれぞれ除菌ろ過等により精製し、無菌操作によりバイアル瓶等に分注小分けした後上記凍結乾燥処理に付すことができる。

本発明の凍結もしくは凍結乾燥したヒトIFN- γ 組成物は、その凍結あるいは凍結乾燥操作および保存中のIFN- γ 活性や品質の低下が極めて少なくまたその再溶解時に凝りが生じないため有用である。また凍結乾燥した組成物は、安定化されたヒトIFN- γ の粉末として得られとりわけ非経口投与製剤として有利に用いることができる。この場合さらにHSAを加えた組成物は、薬品への付着が少なく有利に用いることができる。

本発明の凍結乾燥したヒトIFN- γ 組成物を

注射用製剤として用いる場合は、通常用時、凍結乾燥組成物をバイアル当り1~100mlの注射用蒸留水またはブドウ糖注射液等に溶解し、溶液の浸透圧が生理的に許容される範囲内で使用する。また適当な阻体、賦形剤、希釈剤を用いて眼、耳、鼻内投与用の剤形として用いることができる。

本発明の凍結したもしくは凍結乾燥したヒトIFN- γ 組成物は、低毒性で、公知のヒトIFN- γ と同様の目的に同様の用途により使用することができる。

本発明製剤中、IFN- γ の活性(抗ウイルス活性)として国際単位(IU)は以下により求めた。

単位(ユニット)の確定した国際標準IFN- γ と目的とする資材をヒト羊膜由来F細胞株に對するシンドビスウイルス(Sindbis Virus)の細胞変性効果阻止試験を用いて測定し、その比率から力価を算出して求めた。

なお溶液中の蛋白質は、E:280nm=1.0を1mgとして計算して求めた。

作用および実施例

以下に実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例で用いたIFN- γ は、特に注意しない場合は、参考例1に記載した方法で製造した実質的に無糖類を含まない高濃度ヒトIFN- γ 水溶液を使用した。なお該ヒトIFN- γ は第1図に示すアミノ酸配列を有する。

実施例1~8に記載の組成物の製造においては、結構的なpH調整を行っていないが、これら注射用蒸留水による再溶解時のpHはpH5.5~7の範囲である。

実施例1

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mgを含む 2.4×10^{-4} IU/mlのヒトIFN- γ 水溶液1mlにグリシン15mgを含む再溶解用蒸留水1mlを加え、バイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解して、溶液の清状の内服観察とIFN- γ の力価測定を行った。その結果は第1表に示す。

実施例2

実施例1において、グリシン15mgと共にヒドロキシエチル澱粉(平均分子量20万)37.5mgを配合した以外は実施例1と同様に行った。その結果は第1表に示す。

実施例3

実施例1において、グリシンを30mgに増量し、更にグルタミン酸ナトリウム7.5mgを配合した以外は実施例1と同様に行った。その結果は第1表に示す。

実施例4

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mgを含む 3.7×10^{-4} IU/mlのヒトIFN- γ 水溶液1mlにグリシン30mgを含む再溶解用蒸留水1mlを加え、バイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解して、溶液の清状の内服観察とIFN- γ の力価測定を行った。

対照としてグリシンを配合せずに、除菌ろ過してグルタチオン(還元型)3mgを含むヒトIFN-

γ水溶液1mlをバイアル瓶中で凍結乾燥を行い、同様に1FN-γの力価を測定した。その結果は表1表に示す。

表 1 表

実 施 例	溶 状	力価残存率*
1	澄 明	100%
2	澄 明	94%
3	澄 明	104%
4	澄 明	98%
4 (対照品)	澄 明	86%

* 凍結乾燥前の溶液に対する凍結乾燥品の力

価残存率

実施例5

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mgを含む 4.6×10^{-4} IU/mlのヒト1FN-γ水溶液1mlにグリシン30mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.5mlを加え、-30℃に1週間凍結保存した後、1FN-γの力価を測定した。該凍結品は凍結前の溶液に対して97%の力価を示した。

実施例6

その結果、凍結乾燥前のヒト1FN-γ溶液の力価に対して94%であった。また40℃1カ月保存後の保存開始時の力価に対する残存率は100%と安定であった。

実施例8

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mg/mlを含む 2.6×10^{-4} IU/mlのヒト1FN-γ水溶液0.5mlにグルタミン酸ナトリウム15mgおよびヒドロキソニル炭粉(平均分子重4万)15mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.25mlを加えバイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水0.5mlで再溶解して溶液が澄明であることを確認し、1FN-γの力価測定を行った。

その結果、凍結乾燥前のヒト1FN-γ溶液の力価に対して102%であった。また40℃1カ月保存後の保存開始時の力価に対する残存率は106%と安定であった。

実施例9

グルタチオン(還元型)3mg/mlを含む 3.8×10^{-4} IU/mlのヒト1FN-γ水溶液0.15ml、H

SA 5mg/mlおよびグリシン23mg/mlを含有し、0.1N HClでpH4.5に調整した除菌ろ過した水溶液の名1mlをバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解して溶液が澄明であることを確認し、1FN-γの力価測定を行った。その結果は表2表に示す。

その結果、凍結乾燥前のヒト1FN-γ溶液の力価に対して98%であった。

実施例7

除菌ろ過して得たグルタチオン(還元型)3mg/mlを含む 2.6×10^{-4} IU/mlのヒト1FN-γ水溶液0.5mlにグリシン10mgおよびヒドロキソニル炭粉(平均分子重4万)15mgを含有する除菌ろ過した水溶液0.25mlを加えバイアル瓶中で凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水0.5mlで再溶解して溶液が澄明であることを確認し、1FN-γの力価測定を行った。

SA 5mg/mlおよびグリシン23mg/mlを含有し、0.1N HClでpH4.5に調整した除菌ろ過した水溶液の名1mlをバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解して溶液が澄明であることを確認し、1FN-γの力価測定を行った。その結果は表2表に示す。

実施例10

実施例9において、HSAを10mg/mlに増量した以外は実施例9と同様に行った。その結果は表2表に示す。

実施例11

実施例10において、HSAを20mg/mlに増量した以外は実施例9と同様に行った。その結果は表2表に示す。

実施例12

実施例9において、更にヒドロキソニル炭粉(平均分子重4万)を5mg/mlになるように加えた以外は実施例9と同様に行った。その結果は表2表に示す。

実施例13

実施例10においてグリシンのかわりにグルタミン酸ナトリウムを27mg/mlになるように加え0.1N NaOH水溶液でpH7.8に調整した以外は実施例10と同様に行った。その結果は第2表に示す。

第2表

実施例	溶 状	pH	力価残存率*
9	澄 明	4.5	107%
10	澄 明	4.4	105%
11	澄 明	4.4	98%
12	澄 明	4.6	109%
13	澄 明	7.5	95%

*:凍結乾燥前の溶液に対する凍結乾燥品の力価残存率

参考例3~5で得た実質的に無糖類を含まない高濃度rFN- γ 水溶液を用いても上記実施例と同様の結果が得られる。

実施例14

参考例6に記載の方法で得た 2.5×10^4 IU/

mlのデス¹(Cys-Tyr-Cys)IFN- γ 水溶液0.25ml、HSA 5mg/mlおよびグリシン23mg/mlを含有し、0.1N HClでpH4.5に調整した除菌ろ過した水溶液の各1mlをバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。凍結乾燥品は注射用蒸留水1mlで再溶解した。溶液の溶状は澄明で、pH4.5であった。また凍結乾燥する前の水溶液の力価に対する残存率は96%であった。

実施例15

参考例6に記載の方法で得た 2.5×10^4 IU/mlのデス¹(Cys-Tyr-Cys)IFN- γ 水溶液0.25ml、ヒドロキシエチル澱粉(平均分子量4万)を15mg/mlおよびグリシン23mg/mlを含有するように調整された除菌ろ過した水溶液の各1mlをバイアル瓶に分注し、凍結乾燥を行った。実施例14と同様に再溶解したときの溶液の溶状は澄明でpH6.5であった。また凍結乾燥する前の水溶液の力価に対する残存率は101%であった。参考例1 実質的に無糖類を含まない高濃度rI

FN- γ 水溶液の製造

1

(1) EPC 0 089 679号公開公報実施例8の記載に準じ発現用ヒトIFN- γ 遺伝子を有する菌株RR1(pRK248e1s, pRC231/1/F1-900)を培養してえた凍結菌体1000lに7M塩酸グアニジンおよび2mMフェニルメチルスルホニルフルオリドを含む100mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)を3000ml加え、4℃で1時間静置したのち遠心分離機(17,000rpm/30分)に付し、澄明な上清液をえた。この上清液を13.7mM塩化ナトリウム、2.7mM塩化カリウム、8.8mMリン酸二ナトリウムおよび147nMリン酸カリウムから成る緩衝液(以下PBSと略す)で70倍に希釈し、生じてくる沈殿物をシャープレス遠心分離機(10,000rpm)に付して除去した。次いでえられた上清液2200lをベリコ(ミリボア社製、分画分子量:10,000)で15分まで過ろした。この過ろ液を4℃で一晩放置し、生じた沈殿物をさらにシャープレス遠心分

離機にかけて除去した。この上清液を予め充填した5×30cmの抗体カラム[A(BMo- γ 2-11.1)](EPC 0 103 898号公開公報実施例12参照)に流過1,000ml/時間で負荷したのち、PBSの2,500ml、1M塩化ナトリウムおよび0.1% Tween 20を含んだ10mMリン酸緩衝液(pH7.0)の5,000ml、PBSの2,500mlおよび0.5M塩酸グアニジンを含んだ20mMリン酸緩衝液(pH7.0)の2,500mlの各洗淨液を逐次抗体カラムを通してのち、2M塩酸グアニジンを含む20mMリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出し、抗ウイルス活性を有する溶出液500mlを集めた。

(2) 参考例1(1)の方法で得た溶出液420mlに還元型グルタチオンを10mM濃度添加した。このヒトIFN- γ 水溶液の420mlを予め1nMエチレンジアミン四酢酸塩、150mM塩化ナトリウム、10mM還元型グルタチオンおよび2M塩酸グアニジンを含んだ25mM酢酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したセファクリルS-200(ファ

ルマシア社製のカラム(9×100cm)に負荷し、同一緩衝液で溶出し、モノマー溶出成分450mlを要した。本操作より比活性 3.4×10^4 IU/mgタン白のIFN- γ (0.410mg/ml)を得た。

(Ⅱ) 参考例1(Ⅱ)でえたヒトIFN- γ (モノマー)溶出成分450mlに10mM還元型グルタチオン、150mM塩化ナトリウム、0.5M塩酸グアニジンおよび0.01%ツイーン20を含む25mM酢酸緩衝液(pH6.0)の希釈液3.240mlを添加、混合し、タン白含量0.05mg/mlの低濃度溶液を調製した。この溶液を予め、10mM還元型グルタチオン、150mM塩化ナトリウムおよび0.01%ツイーン20を含む25mM酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25のカラム(14×100cm)に負荷し、同一緩衝液でゲルろ過を行い、塩酸グアニジンを除去したヒトIFN- γ の溶出成分3.180ml(155.8mg)をえた。この溶液のタン白含量は0.049mg/mlであった。タン白回収率は84.4%であった。その比活性は 3.5×10^4 IU/mgタン白であった。この溶液を4℃

で48時間凍蔵させたのち、ダイアフロ-PM-10.43mmφ(アミコン社製膜外ろ過機)を用い、膜外ろ過により159mlまで濃縮した。この濃縮液は澄明で、そのタン白含量は0.92mg/mlであった。タン白回収率は93.9%(146.3mg)であった。なお、ヒトIFN- γ の比活性は 8.8×10^4 IU/mgタン白であった。

(Ⅲ) 上記(Ⅱ)の方法で得たヒトIFN- γ を高濃度に含有する水溶液(タン白含有量:0.952mg/ml)の38mlを予め10mM還元型グルタチオンを含んだ25mM酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25のカラム(5.0×50.0cm)に負荷し、同一緩衝液で展開し、タン白含量0.58mg/mlの實質的に無機塩を含まない(10ppm未満)澄明なIFN- γ 溶液57mlをえた。

このIFN- γ の比活性は 3.7×10^4 IU/mgタン白であった。

参考例2 高濃度IFN- γ 水溶液の製造

参考例1(Ⅲ)の方法で得たヒトIFN- γ を高濃度に含有する水溶液(タン白含有量:0.952mg/ml)

(1)の38mlを予め10mM還元型グルタチオンおよび10mM塩化ナトリウムを含んだ25mM酢酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(5.0×50.0cm)に負荷し、同一緩衝液で展開し、タン白含量0.58mg/mlの塩化ナトリウムを0.04M含む澄明なIFN- γ 溶液52mlをえた。

このIFN- γ の比活性は 4.6×10^4 IU/mgタン白であった。

参考例3 實質的に無機塩を含まない高濃度IFN- γ 水溶液の製造

Ⅱ

(1)特開昭59-89646号公報参考例2に記載の肺炎球菌株エンリヒア コリ(Escherichia coli)294i/pH1T1rφ2101の培養、凍結菌液1kgに7M塩酸グアニジンを含む0.05Mホウ酸緩衝液(pH7.2)を3.000ml加え、4℃で1時間静置したのち、遠心分離(17,000rpm/30分)にかけて澄明な抽出液2700mlをえた。この抽出液を0.137M塩化ナトリウム、2.7mM塩化カ

リウム、8mMリン酸2ナトリウムおよび47mMリン酸1カリウムから成る緩衝液(以下P、B、Sと略す)で10倍に希釈した。次いでこの希釈液にシリカゲル(セパレイション・イングストリ-ズ社製)0.4kgを加え、4℃で45分間操作し、15分間静置したのち、傾斜法で上液を棄てた。このシリカゲルを1M塩化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH7.2)で十分洗浄したのち、カラム(11×11cm)に充填した。次いで0.5M塩化テトラメチルアンモニウムを含む0.01Mホウ酸緩衝液(pH8.0)で溶出し、溶出液200を5×8cmの抗床カラム[Ab(Mo・マ-11):前出]に負荷、750mlのP、B、Sで洗浄したのち、2M塩酸グアニジンを含む0.02Mリン酸緩衝液(pH7.0)で溶出し、抗ウイルス(以下Aと略す)液布を有する成分183mlを収集した。この成分液に還元型グルタチオンを0.01M量(562mg)を添加して比活性 1.1×10^4 IU/mgタン白のIFN- γ 172mgを含む水溶液をえた。

(Ⅱ) 参考例3(1)でえたIFN- γ 含有水溶液

液の183mlを予め1mMエチレンジアミン四酢酸塩、0.15M塩化ナトリウム、0.01M還元型グルタチオンおよび2.5mM塩酸グアニジンを含む25mM酢酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファックスG-250(ファルマシア社製)のカラム(9×79cm)に負荷し、同一緩衝液で展開し、モノマー溶出画分433mlを採集した。このようにしてえられた画分はドデシル硫酸ナトリウムのスラブ電気泳動(以下SDS-PAGEと略す)でモノマーに収斂した。このゲルろ過法により比活性 3.0×10^4 U/mg・タン白のrIFN- γ を142mg含む水溶液をえた。

(E)上記(B)でえたrIFN- γ 含有水溶液の36.6ml(12.0mg)に、0.01M還元型グルタチオンおよび0.5M塩酸グアニジンを含む25mM酢酸緩衝液(pH 6.0)の163.4mlを添加し、0.06mg/ml濃度溶液を2.0ml調製した。この溶液を予め0.01M還元型グルタチオンを含む25mM酢酸緩衝液(pH 6.0)で平衡化したセファックスG-25(ファルマシア社製)カラム(5×60cm)に負荷し、同一緩

衝液で展開溶出し、rIFN- γ 画分220mlをえた。この溶液のrIFN- γ 濃度は0.047mg/mlであった。次いでこの溶液を4℃で2日間熟成したのち、ジアフロ-PM-10膜(アミン社製限外ろ過膜)の限外ろ過法で14mlにまで濃縮し、タン白含量0.711mg/mlで実質的に無機塩(10ppm未満)を含まないrIFN- γ 溶液をえた。このようにしてえられた高濃度rIFN- γ はSDS-PAGEでモノマーに収斂した。このrIFN- γ の比活性は 3.6×10^4 U/mg・タン白であった。

参考例4 実質的に無機塩を含まない高濃度rIFN- γ 水溶液の製造

B

参考例1(B)でえたrIFN- γ 水溶液の35ml(11.48mg)に、0.01M還元型グルタチオンおよび0.5M塩酸グアニジンを含む25mM酢酸緩衝液(pH 6.0)の165mlを添加して調製した0.057mg/ml濃度溶液2.00mlを予め0.01M還元型グルタチオン溶液(pH 6.0)で平衡化したセファックスG-

25カラム(5×60cm)に負荷し、0.01M還元型グルタチオン溶液(pH 6.0)で展開し、rIFN- γ の溶出画分235mlをえた。この溶液のrIFN- γ 濃度は0.046mg/mlであった。次いでこの溶液を4℃で1日間熟成したのち、ジアフロ-PM-10膜の限外ろ過法にて10mlにまで濃縮し、タン白濃度1.08mg/mlで実質的に無機塩(10ppm未満)および酢酸緩衝液を含まない透明なrIFN- γ 水溶液をえた。このようにしてえられたrIFN- γ はSDS-PAGEでモノマーに収斂した。このrIFN- γ の比活性は 3.6×10^4 U/mg・タン白であった。

参考例5 実質的に無機塩を含まない高濃度rIFN- γ 水溶液の製造

B

参考例1(B)でえたrIFN- γ の35ml(11.48mg)に、0.01M還元型グルタチオンおよび0.5M塩酸グアニジンを含む25mM酢酸緩衝液(pH 6.0)の165mlを添加して、0.057mg/ml濃度の溶液を2.00ml調製した。この溶液を予め0.267Mグ

リニンと0.01M還元型グルタチオンを含む溶液(pH 6.0)で平衡化したセファックスG-25カラム(5×60cm)に負荷し、同一緩衝液で展開し、rIFN- γ の溶出画分220mlをえた。この溶液のrIFN- γ 濃度は0.046mg/mlであった。次いでこの溶液を4℃で2日間熟成したのち、ジアフロ-PM-10膜の限外ろ過法で9.4mlにまで濃縮し、タン白含量1.07mg/mlで実質的に無機塩(10ppm未満)および酢酸緩衝液を含まない透明なrIFN- γ 溶液をえた。このrIFN- γ はSDS-PAGEでモノマーに収斂し、その比活性は 3.82×10^4 U/mg・タン白であった。

参考例6

実質的に無機塩を含まない高濃度デス(Cys-¹
Tyr-Cys)²IFN- γ 水溶液の製造

(i) 形質転換体の製造

IFN- γ 発現プラスミドpRC23/IF1-900[EP-C公開第0089676号公報実
施例7参照]を制限酵素NcoI、NcoIで消化し、

IFN- γ 遺伝子部分を含むNdeI-NcoI 710bp DNA断片(A)を分取した。一方、プラスミドpRC23を制限酵素BglII, EcoRIで消化し、 λ プロモーターを含む265bpのDNA断片(B)を分取した。(A),(B)と化学合成した得た蛋白合成開始コドンを含むオリゴヌクレオチドアダプター

AATTCATCGCAGGATCCAA

GTCAGTCCTAGGTAAT

を用いたDNAリガーゼを用いてNdeIとEcoRIののりしろ部分に結合させた。得られたDNA断片をNcoIとBglIIで処理して得たプラスミドpRC23/1F1-900に結合させ、 Cys^{-} -

Tyr^{-} - Cys 欠落IFN- γ のポリペプチドをコードする発現プラスミドpLC2を構築した(第2図)。このプラスミドpLC2を用いてCohenらの方法[ブローニングス オブ ナショナルアカデミー オブ サイエンス, 69, 2110 (1972)]に従って大腸菌RRI(pRK248 ci

is)を形質転換し、形質転換体Eシエリコリ(Escherichia coli = E. coli)RRI(pLC2, pRK248 cis)を得た。

(ii) 形質転換体の培養

上記(i)で構築したプラスミドを含む菌体E. coli RRI(pLC2, pRK248 cis)を1%バクトトリプトン, 0.5%酵母エキース, 0.5%食塩, 7 μ g/mlテトラサイクリンを含む液体培地50ml中で、35℃, 12時間振とう培養を行った。培養液を0.5%カザミノ酸, 0.5%グルコース, 7 μ g/mlのテトラサイクリンを含むM培地2.5lに移し、35℃4時間、ついで42℃で3時間培養した。遠心分離して菌体を集め、-80℃で保存した。

(iii) 精製

上記(ii)と同様の方法で得た凍結菌体7.1gを7M塩酸グアニジンおよび2mMフェニルメチルスルフォニルフルオリドを含む0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.0)22mlに懸濁し、4℃で1時間凍結したのち10,000 \times gで30分間遠心分離にかけ

て上清2.4mlを得た。この上清に137mM塩化ナトリウム, 27mM塩化カリウム, 81mMリン酸二ナトリウムおよび1.5mMリン酸一カリウムから成る緩衝液(pH7.4)300mlを加えて希釈し、試体カラム(Mo γ 2-11.1, カラム容積15ml)に流速1ml/分でかけた。そのうち、0.5M塩酸グアニジンを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.8)60mlでカラムを洗浄し、ついで、2M塩酸グアニジンを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)45mlで溶出し、試ウイルス活性を有する画分2.5mlを得た。この画分2.5mlをあらかじめ1mMエチレンジアミン四酢酸, 0.15M塩化ナトリウム, 10mMシステインおよび2M塩酸グアニジンを含む25mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファクリルS-200(ファルマシア社製)のカラム(2.6 \times 94cm), カラム容積500ml)にかけ、同一緩衝液で溶出しして試ウイルス活性を有する画分40mlを得た。

ここで得られた Cys^{-} - Tyr^{-} - Cys 欠落IFN- γ

のポリペプチド[デス(Cys^{-} - Tyr^{-} - Cys)IFN- γ]は、7.0mgであり、比活性は 2.7×10^4 IU/mgであった。

(iv) 高濃度水溶液の製造

上記(iii)でえたデス(Cys^{-} - Tyr^{-} - Cys)IFN- γ を含む溶出画分2.2ml(タンパク濃度0.18mg/ml)を0.5M塩酸グアニジンを含む25mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.0)17.5mlで希釈した。この溶液をあらかじめ25mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH6.0)で平衡化したセファデックスG-25カラム(2.6 \times 15cm)に負荷して、同一緩衝液で溶出し、塩酸グアニジンを除去したデス(Cys^{-} - Tyr^{-} - Cys)IFN- γ の溶出画分2.3ml(タンパク濃度0.018mg/ml)を得た。

本溶出画分を4℃で24時間加熱したのち、グアイアフロ-YM-10(25mm ϕ , アムン社)を用いて膜外ろ過により濃縮し、フィルター(0.2 μ m)でろ過し0.68mlの透明な溶液を得た。タンパク濃度は0.41mg/mlであった。

発明の効果

本発明の実質的に無機塩が存在せず、アミノ酸が見存する条件下に凍結もしくは凍結乾燥したヒトIFN- γ 組成物は、その凍結あるいは凍結乾燥操作および保存中においてIFN- γ 活性の低下が極めて少なくまたその再溶解時に凝りが生じないため医薬品等として有利に使用することができる。

4 図面の簡単な説明

第1図は145個のアミノ酸からなるrIFN- γ のアミノ酸配列の一例を示す。第2図は参考例6(1)に開示するプラスミドpLC2の構築図を示す。

代理人 弁理士 天井 啓 次



398 1 021

1
Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu
20
Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala
Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr
40
Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys
Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser
60
Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln
80
Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met
Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys
100
Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn
Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg
120
Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met
Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly
140
Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
146
Gly Arg Arg Ala Ser Gln

第 2 図

